

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019393

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-435085  
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 31 March 2005 (31.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

04.2.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 2 6 日  
Date of Application:

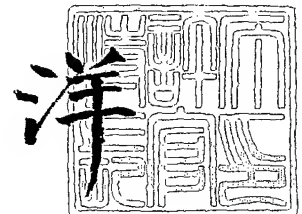
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 3 5 0 8 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P - 2 0 0 3 - 4 3 5 0 8 5 ]

出   願   人            萩 原   正 敏  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   3 月 1 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-1131  
【提出日】 平成15年12月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 31/00  
C12N 9/00  
C12N 15/00

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県千葉市花見川区浪花町 9 1 2 - 8  
【氏名】 萩原 正敏

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都文京区西片 2 - 7 - 1 - 2 5  
【氏名】 福原 武志

【特許出願人】  
【識別番号】 598120001  
【氏名又は名称】 萩原 正敏

【代理人】  
【識別番号】 100091096  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】  
【識別番号】 100096183  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】  
【識別番号】 100118773  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤田 節

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 015244  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

S R 蛋白質の活性を制御する S R 活性制御剤を有効成分として含有する抗ウイルス剤。

## 【請求項 2】

S R 蛋白質が、SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, HRS/SRp40, SRp46, 又は SRp75 のいずれかである請求項 1 記載の抗ウイルス剤。

## 【請求項 3】

S R 活性制御剤が S R 蛋白質の脱リン酸化を促進する物質又は組成物である請求項 1 又は 2 項記載の抗ウイルス剤。

## 【請求項 4】

フォスファターゼ 2 A (Phosphatase 2A) を活性化する活性化剤である請求項 3 項記載の抗ウイルス剤。

## 【請求項 5】

HIV の tat 遺伝子又はアデノウイルスの E4-ORF4 遺伝子又はワクシニアウイルスの V H 1 遺伝子 を 載 せ た 遺 伝 子 治 療 用 の 発 現 ベ ク タ ー で あ る 請 求 項 4 記 載 の 抗 ウ イ ル ス 剤 。

## 【請求項 6】

S R 活性制御剤が S R P K を阻害する物質である請求項 1 又は 2 記載の抗ウイルス剤。

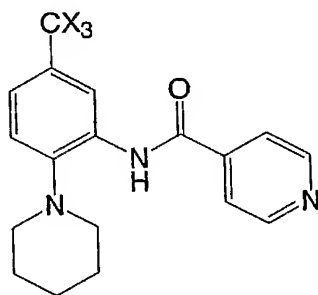
## 【請求項 7】

S R P K が S R P K 1 または S R P K 2 である請求項 6 記載の抗ウイルス剤。

## 【請求項 8】

S R P K を阻害する物質が下記一般式で示される化合物である請求項 7 記載の抗ウイルス剤。

## 【化 1】

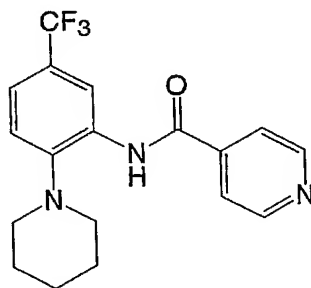


上記式中 X は、F、Cl、Br、I 又は At を意味する。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載の一般式で示される化合物が下記式で示される SRPIN-1 である請求項 8 記載の抗ウイルス剤。

## 【化 2】



## 【請求項 10】

S R 活性制御剤が S R P K 遺伝子の発現阻害剤である請求項 1 又は 2 記載の抗ウイルス

剤。

【請求項 11】

S R P K 遺伝子の発現阻害剤が、S R P K に対する miRNA 又は siRNA 又はモルフォオリゴである請求項 10 記載の抗ウイルス剤。

【請求項 12】

S R 活性制御剤が S R 蛋白質の活性と逆の活性を有する物質である請求項 1 又は 2 記載の抗ウイルス剤。

【請求項 13】

S R 蛋白質の活性と逆の活性を有する物質が hnRNP A1 発現ベクターである請求項 12 記載の抗ウイルス剤。

【請求項 14】

ウイルスが、(1) ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I)、A 型、C 型、D 型又は E 型肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、若しくはインフルエンザウイルスのいずれかの RNA 型ウイルス、又は (2) 単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B 型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、若しくはヒトパピローマウイルスのいずれかの DNA 型ウイルスである、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の抗ウイルス剤。

【請求項 15】

試験化合物を S R P K に作用させる工程、及び S R P K の S R 蛋白質をリン酸化する能力を検定する工程を含む SRPK 阻害剤を選抜することを含む、抗ウイルス剤のスクリーニング方法。

【請求項 16】

SR タンパク質又は RS 若しくは SR の 2 回以上連続するペプチドを SRPK の基質として SRPK 阻害剤を検定する工程を含む請求項 15 のスクリーニング方法。

【請求項 17】

請求項 15 又は請求項 16 の方法により得られた抗ウイルス剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】SR蛋白質のリン酸化制御方法、および、SR蛋白質の活性制御剤を有効成分とする抗ウイルス剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子発現過程におけるスプライシング反応に関与しているSR蛋白質のリン酸化制御に関する。さらにウイルス等の感染による慢性および急性疾患の治療及び予防に有用なSR蛋白質の活性制御、発現制御および安定化制御方法並びにSR蛋白質の活性制御剤を有効成分とする抗ウイルス剤に関する。

【背景技術】

【0002】

これまでウイルスの複製を阻害すると報告されている数多くの抗ウイルス剤は、ウイルスプロテアーゼやウイルスの持つ逆転写酵素などを標的としたものであった。

【0003】

例えば、HIVウイルスについて言えば、HIVのゲノムの特性をターゲットにする手法が用いられている。HIVは、逆転写酵素によりHIVのRNAゲノムがDNA（プロウイルス）に変換されて宿主染色体に組み込まれ、次に、プロウイルスDNAから宿主細胞の転写、翻訳機構によりウイルスのタンパク質が生産され、これらのタンパク質は大きなポリプロテイン前駆体として転写され、プロテアーゼにより蛋白分解されてはじめて、ウイルスが再構成され、成熟する。そこでHIVの阻害剤については、このようなHIVの成熟過程のそれぞれをターゲットに、（1）レトロウイルス特有の逆転写酵素をターゲットとするAZT等（非特許文献1）、（2）プロテアーゼを阻害するプロテアーゼ阻害剤（非特許文献2）が研究開発されてきた。

【0004】

しかしながら、いずれも種々のウイルスの増殖過程を特異的に攻撃する個別的に対応の抗ウイルス剤であった。

【0005】

【非特許文献1】Proc Natl Acad Sci USA Vol.86, No.21, pp.8333-7

【非特許文献2】Antimicrob Agents Chemother. 1995 Jul;39(7):1559-64

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ウイルス特にRNAウイルスは、突然変異速度が速いため、これまで開発されたウイルスプロテアーゼやウイルスの持つ逆転写酵素などを標的とした抗ウイルス剤は、有効性が失われることも早く、更なる、効果的な抗ウイルス剤の開発が望まれてきた。

【0007】

特に、最近、SARSをはじめ、種々の新規なウイルスの出現に伴い、新規なウイルスにも対応できる、適用性が広く、しかも、持続性の高い抗ウイルス剤の開発を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、従来から、遺伝子発現系に関与するSRタンパク質のリン酸化に関する研究を行ってきた。特にSRタンパク質をリン酸化する酵素である、SRPK2 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 357-364)、線虫のSRPK相同分子であるSPK1 (Mech. Dev. 99, 51-64)、hPRP4 (J. Biol. Chem. 277, 44220-44228)、およびSRタンパク質リン酸化酵素Clk4の制御因子CLASP (J. Biol. Chem. 276, 32247-32256) は本発明者が世界で初めてクローニングしたものである。

【0009】

SR蛋白質は、SerineとArginineに富むRNA結合蛋白質で、通常1ないし2ヶ所のRNA認識モチーフ(RRM)とRSの連続配列に富むRS(Arginine/Serine-rich)ドメインを共通に持ち、

真核生物におけるRNAプロセッシング、特に、pre-mRNAのスプライシングに重要な役割を果たしている。

【0010】

哺乳類のSR蛋白ファミリーとして、X16/SRp20, SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, 9G8, HRS/SRp40, SRp46, SRp55, SRp75, p54の10種類のRNA結合蛋白が報告されている。SRタンパク質の多くが細胞内でリン酸化を受けていることが示されており、特にSRタンパク質のひとつであるSF2/ASFは、ペプチドマッピングによる解析から、RSドメイン内の複数の部位でリン酸化されている(J. Cell. Biol. (1991) 115: 587-596)ことが確認されている。またSF2/ASFのU1snRNPへの選択的結合能は、リン酸化によって高まる(Genes & Dev. (1997) 11: 334-344)ことが知られている<sup>1)</sup>。RSドメインのリン酸化と脱リン酸化が、スプライソゾームの形成と組み換えに必要で、これを阻害すると、mRNAのプロセッシングに異常を来す。上述したように、RSドメインはRNA結合蛋白のみならず、核内で機能すると目される様々な機能蛋白に見い出され、それらはSR関連蛋白ファミリー(SR-related protein family)と名付けられている(Biochem. Cell Biol. (1999) 77: 277-291)。

【0011】

本発明者らは、ウイルスに感染した細胞中のSRファミリータンパク質のリン酸化状態を研究中に偶然にも、ウイルス感染した細胞中ではSRタンパク質のリン酸化が抑えられ、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることを発見した。逆に、SRp40又はSRp75などのSRタンパク質、又はSRタンパク質リン酸化酵素のSRPK1又はSRPK2を強制的に発現させたところ、SRタンパク質が安定化されウイルス産生が増加するという現象を見出した。このことは、SRタンパク質がウイルス複製に重要な役割を担っており、SRタンパク質の脱リン酸化は、生体内のウイルス侵入に対する防御システムであることを示している。

【0012】

SR蛋白はU1snRNPやU2AFと結合しスプライソゾームの形成に必要なだが、その蛋白間相互作用にRSドメインが大きな役割を果たしていると考えられている。また、SR蛋白(はスプライス部位の選択に影響を与え、イントロンに近位の3' スプライス部位の選択を促進するのに対し、逆にhnRNP A1、A2、B1などのheteronuclear ribonucleoproteins (hnRNPs)は遠位の3' スプライス部位の選択を促す。従って細胞内のSR蛋白とhnRNP蛋白の量比によって、スプライス部位が決められている可能性がある。

【0013】

そこで、本発明者らは、ウイルスの複製に重要な役割を果たしていることが分かったSRタンパク質を対象とした抗ウイルス剤の開発し、提供したものである。

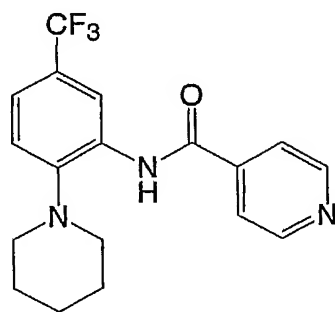
【0014】

具体的には、まず、SR蛋白質のリン酸化酵素を阻害することによるSR蛋白質の阻害を試みた。

これまでSRPKの活性を阻害する低分子量化合物は知られていなかったところ、SRPKを標的とした低分子量化合物のスクリーニングを行い、結果として下記の式で表されるSRPIN-1 (SR protein phosphorylation inhibitor 1) がリン酸化酵素SRPKの阻害活性を有することを見出した。

【0015】

## 【化1】



## 【0016】

そこで、SRPIN-1を用いてSRPKの酵素活性を阻害することで、SR蛋白質のリン酸化を阻害し、結果としてHIVのウイルス複製を阻害できると推測した。MT-4細胞とHIVウイルスを用いた感染実験において、SRPIN-1の濃度を変えてウイルス複製を抑制できるか検討したところ、SRPIN-1は顕著にHIVウイルスの複製を抑制することを見出した。

## 【発明の効果】

## 【0017】

本発明により、SRPIN-1 (SR protein phosphorylation inhibitor 1) がリン酸化酵素SRPKの阻害活性を有することが明らかにされた。SR蛋白質はSRPKによるリン酸化によって細胞中で安定に存在しているが、SRPIN-1によってSRPKの酵素活性を阻害すると、SR蛋白質のリン酸化が阻害され、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることを見出した。そこでSRPIN-1を添加してSRPKの阻害を試みたところ、HIV感染実験ではSRPIN-1にウイルス複製を抑制する抗ウイルス作用を有することを見出した。

## 【0018】

更に、本発明は、SR蛋白質の活性を制御することにより、同一のメカニズムで、広範囲なウイルスに対して有効な抗ウイルス剤を提供するという効果を奏するものである。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0019】

本願発明者等は、SR蛋白質をリン酸化するSRPK酵素を阻害することにより、HIVの複製を阻害することができることから、この現象を広く応用することにより、広範囲なウイルスに対して、抗ウイルス剤を提供できるかを検討した。

## 【0020】

## I. SR蛋白質 活性の低減：分解と安定化

(1) 本願発明者等は、細胞のHIVウイルスによる感染とSR蛋白質のリン酸化状態及びSR蛋白質の細胞での存在の有無の関係について調べた。具体的には、NL4-3タイプのHIVウイルスを293細胞に感染させた後、SR蛋白質に対する抗体及びリン酸化されたSR蛋白質に対する抗体によって、細胞中のリン酸化された蛋白質と細胞中でのSR蛋白質（全量）を調べた。

## 【0021】

また、SR蛋白質をリン酸化するSRPKを強制的に発現させた細胞へのHIVウイルスによる感染と同細胞内のSR蛋白質のリン酸化状態及びSR蛋白質の細胞での存在の有無の関係についても調べた。具体的には、上記と同様に、NL4-3タイプのHIVウイルスをSRPK-2を強制的に発現させた293細胞に感染させた後、SR蛋白質に対する抗体及びリン酸化されたSR蛋白質に対する抗体によって、同細胞中のリン酸化された蛋白質と細胞中でのSR蛋白質（全量）を調べた。

## 【0022】

上記の結果から、SR蛋白質はリン酸化されることで細胞中で安定化するが、逆に、SR蛋白質を脱リン酸化させることにより、SR蛋白質を分解させることができることが分かった。



## 【0023】

さらに、検証のため、本願発明者等は、SR-HA融合蛋白質を293細胞内に発現させ、ユビキチン・プロテアソーム阻害剤であるMG132の添加の有無により、抗HA-抗体に反応する融合SR-HAのシグナル強度を測定したところ、MG132により、蛋白質分解が抑制されていることが見られたので、SR蛋白質は、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解されることがわかった。

## 【0024】

すなわちウイルス感染に応答して、宿主は防御機構としてSR蛋白質の分解を行うと推測された。しかしSR蛋白質のリン酸化酵素を強制発現した状態では、SR蛋白質はリン酸化されることで分解されずに安定化され、防御機構を破綻してウイルス産生の昂進に寄与することを見出した。

## 【0025】

つまり、SR蛋白質は、脱リン酸化されることで、ユビキチン・プロテアソーム経路で分解されてしまうことが分かった。SR蛋白質は、遺伝子転写に必須であるから、SR蛋白質を脱リン酸化することにより、ウイルスの増殖阻害ができることが分かった。

## 【0026】

(2) 次に、SR蛋白質のリン酸化酵素の阻害を検討した。SR蛋白質のリン酸化を担うリン酸化酵素としてはSRPK1/2、Clk/Sty family kinase、PRP4、DNA topoisomerase Iなどが候補と考えられているが、スプライシングにおける各々の機能差については不明な点が多い。そこで、本願発明者等は、SRPKを阻害することによる、ウイルス感染細胞からのウイルス産生状態を、SRPK阻害剤であるSRPIN-1を用いて調べた。

## 【0027】

すると、SRPIN-1によるSRPKの阻害が、積極的なSR蛋白質の分解を引き起こすことを見出した。

## 【0028】

(3) 更に、またHIVの感染と同時に、スプライシングを促進するSR蛋白質と、in vitroでは拮抗して働くことが知られているhnRNPA1を細胞に強制発現させたところ、SRp40とSRp75はHIV産生を更に昂進させ、hnRNPA1の量依存的にHIV産生を抑制することを初めてin vivoで見出した。

## 【0029】

以上のように、SR蛋白質の脱リン酸化は、生体（人体）のウイルスに対する防御反応であり、既に、アデノウイルス及びワクシニアウイルスについては、動物細胞に感染後、当該動物細胞内でのSR蛋白質が脱リン酸化されることは確かめられており（Nature Vol. 393, pp. 185-187, EMBO Rep Vol. 3, pp. 1088-1093）、上記のように脱リン酸化されると、SR蛋白質は速やかに分解され、ウイルスの遺伝子の発現に利用できなくなり、結局これらのウイルスも、増殖できないものと考えられる。

## 【0030】

従って、SR蛋白質の活性を制御することによる抗ウイルス作用は、広範なウイルスに対して有効であるといえる。

## 【0031】

II. 本願発明には、SR蛋白質の活性を制御することによる、抗ウイルス剤、ウイルス産生阻害方法、及びウイルス病治療方法が包含される。本願発明には、SR蛋白質活性制御剤を有効成分として含む抗ウイルス剤が包含される。ここで、SR蛋白質の活性の制御には、発現制御および安定化制御も含まれる。

## 【0032】

[制御対象SR蛋白質]

なお、本願発明で活性を低減又は阻害させるべきSR蛋白質は、任意のSR蛋白質、すなわち、X16/SRp20, SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, 9G8, HRS/SRp40, SRp46, SRp55, SRp75, 及びp54が含まれるが、好適には、SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, HRS/SRp40, SRp46, 及びSRp75であり、特に好適には、SRp40及びS

Rp75である。以下でSR蛋白質というときは、SF2/ASF/SRp30a, SC35/PR264/SRp30b, SRp30c, HRS/SRp40, SRp46, 又はSRp75を意味する。

【0033】

[対象ウイルス]

本発明の抗ウイルス剤は、特にHIVの増殖阻害に好適であるが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に限らず、RNA型ウイルスに属する重症急性呼吸器症候群(SARS)、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-I)、A型、C型、D型又はE型等のB型以外の肝炎ウイルス、ワクシニアウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ヒトコロナウイルス、エボラ出血熱ウイルス、インフルエンザウイルスを含めたウイルスについても、同様の効果の効果を有する。

【0034】

またDNA型ウイルスである単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスについても感染にともなう宿主の防御機構としてSR蛋白質の脱リン酸化が報告されていることから、SRPIN-1の効果は単純ヘルペスウイルス、ヒトアデノウイルスを含め、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス、天然痘ウイルス、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルスについても、同様の抗ウイルス活性を有する。

【0035】

[抗ウイルス剤]

本願発明には、(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによる抗ウイルス剤、より具体的には、(i)SR蛋白質の脱リン酸化を促進させることによる抗ウイルス剤、及び(ii)SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによる抗ウイルス剤が包含される。

【0036】

更に、本願発明には、(2)SR蛋白質の発現を阻害することによる抗ウイルス剤、並びに、(3)SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによる抗ウイルス剤が包含される。

【0037】

[ウイルス産生阻害方法]

また、本願発明には、(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによるウイルスの産生阻害方法、より具体的には、(i)SR蛋白質の脱リン酸化を促進させることによるウイルスの産生阻害方法、及び(ii)SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによるウイルスの産生阻害方法が包含される。

【0038】

更に、本願発明には、(2)SR蛋白質の発現を阻害することによるウイルスの産生阻害方法、並びに、(3)SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによるウイルスの産生阻害方法が包含される。

【0039】

[治療方法]

本願発明には、(1)SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによるウイルス病の治療又は予防方法、より具体的には、(i)SR蛋白質を脱リン酸化させることによるウイルス病の治療又は予防方法、及び(ii)SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによるウイルス病の治療方法が包含される。

更に、本願発明には、(2)SR蛋白質の発現を阻害することによるウイルス病治療又は予防方法、並びに、(3)SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによるウイルス病治療又は予防方法が包含される。

【0040】

III.更に本願発明には、抗ウイルス剤のスクリーニング方法、並びにSRPK酵素阻害剤の利用が含まれる。

【0041】

## [抗ウイルス剤のスクリーニング方法]

更に本願発明には、(1) SR タンパク質若しくはRS又はSRの2回以上連続するペプチドをSRPKの基質としてSRPK阻害剤をスクリーニングする方法が包含される。

## 【0042】

## [SRPK酵素阻害剤及びその利用]

更に、本願発明には、(1) SRPIN-1を有効成分として含むSRPK酵素阻害剤、(2) SRPIN-1を有効成分として含むウイルス増殖阻害剤、及び(3) SRPIN-1を有効成分として含む抗ウイルス治療薬が包含される。

## 【0043】

## IV. 本願発明の具体的開示

(1) SR蛋白質の活性を低減又は阻害する抗ウイルス剤

(i) SR蛋白質を脱リン酸化させることによる抗ウイルス剤

SR蛋白質を脱リン酸化させることによる抗ウイルス剤としては、Phosphatase 2Aを活性化する活性化剤が含まれ、具体的には、HIVのtat遺伝子がコードするポリペプチド又はアデノウイルスのE4-ORF4がコードするポリペプチド又はワクシニアウイルスのVH1がコードするポリペプチドが含まれる。さらに、HIVのtat遺伝子又アデノウイルスのE4-ORF4遺伝子又はワクシニアウイルスのVH1遺伝子を載せた遺伝子治療用の発現ベクターが含まれる。

## 【0044】

(ii) SR蛋白質のリン酸化酵素阻害剤

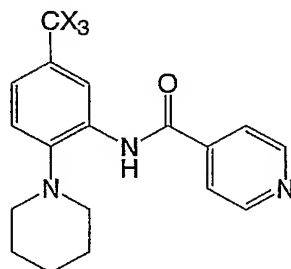
(ii-1) SR蛋白質をリン酸化する酵素としては、既に種々のリン酸化酵素が知られているが、これらの酵素は、RSドメインのリン酸化部位が異なると考えられており、これらRSリン酸化酵素のうち、SR蛋白質の安定化に寄与する特定のリン酸化を行いうる酵素としては、SRPKのみであることを本発明者らは発見した。そこで、SR蛋白質のリン酸化による安定化を防ぐために、標的とするSR蛋白質をリン酸化する酵素としては、SR蛋白質のリン酸化酵素の内、特に、SRPKがあげられ、SRPKとしては、SRPK1 (Nature(1994) Vol. 369, pp. 678-682) 及びSRPK2 (Biochem Biophys Res Commun (1998) Vol. 242: pp. 357-364) の両者を挙げるができる。

## 【0045】

本願発明の方法で用いるリン酸化酵素 (SRPK) を阻害する機能を有する物質としては、次の一般式で示される新規物質SRPIN-1及びその類縁体を用いることができる。

## 【0046】

## 【化2】

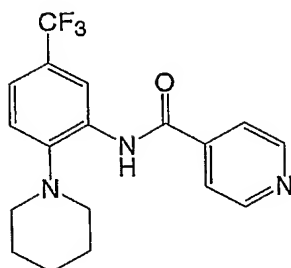


## 【0047】

Xとしては、F、Cl、Br、I又はAtを挙げるができる。  
具体的には、下記のSRPIN-1を挙げるができる。

## 【0048】

## 【化3】

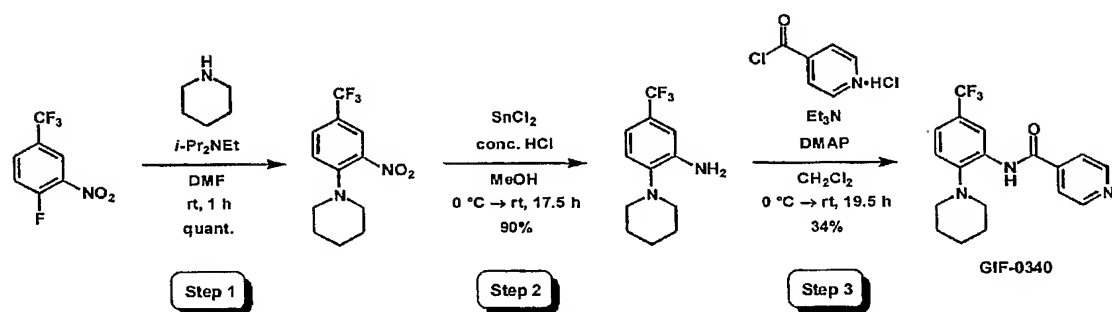


## 【0049】

本発明のSRPK-1は、Maybridge社より入手できるが、概略次のように化学合成することができる。

## 【0050】

## 【化4】



## 【0051】

(ii-2) SRPK1遺伝子及びSRPK2遺伝子に対するRNAiを利用する抗ウイルス剤

細胞内でのSRPK1をコードする遺伝子及びSRPK2をコードする遺伝子の発現を低下させるために、siRNA、モルフォオリゴ、又はmiRNAを用いることができる。

## 【0052】

siRNAの設計には、周知の方法を用いることができるが、例えば、次のような方法で設計することができる。

## 【0053】

(ii-2-1) siRNAのターゲット配列としては、5'側や3'側のUTR（非翻訳領域）やスタートコドン付近を避け、スタートコドンより50塩基以上下流の領域であって、ORF中で、AAから始まる又はNAから始まる19~21塩基（19塩基が最も一般的）でCG含量が50%前後で、可能な限り5'や3'への偏りや繰り返し配列が少ない配列を用いることができる。

## 【0054】

siRNAは、AAから始まる場合は、dTdTまたはUU2塩基のオーバーハング、NAから始まるターゲット配列の場合にはdTdN又はdTdT、UUをつけて調製することができる。

## 【0055】

なお、目的するターゲット配列以外と交差反応を起こし、目的以外のタンパク質の発現に影響を及ぼすことを防ぐため、選び出した配列はBLASTサーチ等を用いて他のRNA配列との類似性を確認する。

## 【0056】

なお設計されたsiRNAを細胞内で発現するように調製した、siRNA発現ベクターも含まれ

る。

【0057】

(2) SR蛋白質をコードする遺伝子の発現を阻害することによる抗ウイルス剤には、例えば、siRNA、モルフォオリゴ、又はmiRNAが包含される。

(2-1) siRNA、

siRNAの設計には、上記(ii-2)の方法を用いることができる。

【0058】

(3) SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質又は該蛋白質を活性化することによる抗ウイルス剤

(3-1) SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質としては、hnRNP A1、A2、及びB1などのheteronuclear ribonucleoproteins (hnRNPs)を挙げることができるが、好適には、hnRNP A1を挙げることができる。更に好適には、hnRNP A1をコードする遺伝子を遺伝子治療用発現ベクターに載せた抗ウイルス剤が挙げられる。

【0059】

(4) SRPKを阻害する物質をスクリーニングすることによる抗ウイルス剤のスクリーニング方法。

本願発明には、SRPK1若しくはSRPK2をターゲットとする種々の化合物を、SRタンパク質若しくはRS又はSRの2回以上連続するペプチドをSRPKの基質としてSRPK阻害剤をスクリーニングすることを含む抗ウイルス剤のスクリーニング方法も包含する。

【0060】

更に、本願発明には、上記抗ウイルス剤をウイルス増殖阻害剤又は抗ウイルス治療薬として用いることも包含される。例えば、抗ウイルス剤としてSRPIN-1を用いる場合、SRPIN-1以外に周知の製薬助剤を添加することができ、例えば、AZTやプロテアーゼ阻害剤を添加することができる。

【0061】

本発明のウイルス増殖阻害剤又は抗ウイルス治療薬は、例えば、体内濃度が100nM-1mMの間にいずれかになるように、間歇的若しくは持続的に、経口、経皮、粘膜下、皮下、筋肉内、血管内、脳内、又は腹腔内に投与することができる。

【実施例】

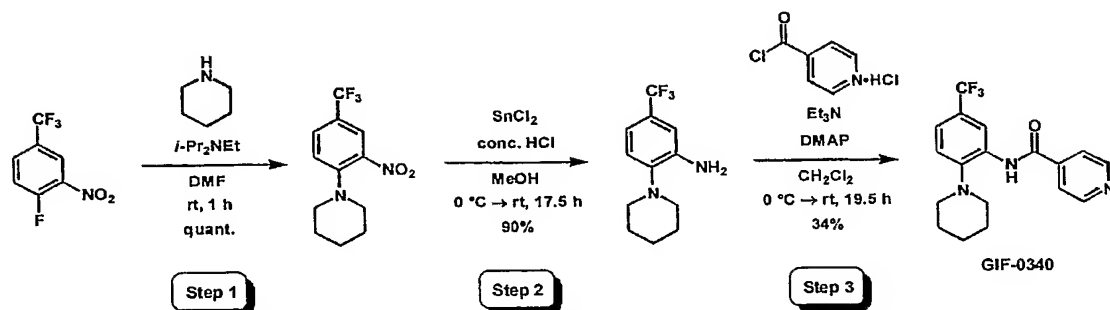
【0062】

[参考例1] SRPIN-1の合成

SRPIN-1(code name GIF-0340)の代表的な合成法は以下の通りである。

【0063】

【化5】



【0064】

[Step 1]

1-フルオロ-2-ニトロ-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene) (427 mg, 2.04 mmol、商用品)のN,N-ジメチルフォル

ムアミド (N,N-dimethylformamide (DMF)) (1 mL) 溶液に連続的に ピペリジン (piperidine) (220  $\mu$ L, 2.22 mmol) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (N,N-diisopropylethylamine) (220  $\mu$ L, 2.40 mmol) が室温で添加された。混合物は、1 時間攪拌された。これに、水が添加され、混合物はエーテル (x 3) で抽出された。抽出された有機混合物は、ブラインで洗浄、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥、フィルターにかけ、減圧下で濃縮された。

## 【0065】

残査は、シリカゲルカラム (40 g, hexane/ethyl acetate = 10/1) で精製され、1 - [2-ニトロ-4-(トリフルオロメチル) フェニル] ピペリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]piperidine) (561 mg, 2.04 mmol, quant.) を オレンジ色の固体として得た。

## 【0066】

TLC 及び <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。: TLC R<sub>f</sub> 0.47 (hexane/acetone = 16/1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d 1.61-1.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.72 (tt, 4H, J = 5.3, 5.3 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 3.13 (t, 4H, J = 5.3 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 7.13 (d, 1H, J = 8.8 Hz, aromatic) 7.61 (dd, 1H, J = 2.0, 8.8 Hz, aromatic), 8.03 (d, 1H, J = 2.0 Hz, aromatic).

## 【0067】

## [Step 2]

1 - [2-ニトロ-4-(トリフルオロメチル) フェニル] ピペリジン (1-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]piperidine) (559 mg, 2.03 mmol) の methanol (10 mL) 溶液に連続的に濃縮HCl (2.00 mL, 24.0 mmol) and SnCl<sub>2</sub> (2.50 g, 13.1 mmol) が 0 ° C で添加された。混合物は、室温に戻され、17.5 時間攪拌された。これに重炭酸ナトリウムの飽和水溶液が添加された。混合物は酢酸エチル (x 3) で抽出された。The 有機抽出物混合物はブラインで洗浄されNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥され、濾過され、減圧濃縮された。残査はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (50 g, hexane/ethyl acetate = 14/1)

で精製され、2 - (1-ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) ベンゼンアミン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)benzenamine) (448 mg, 1.83 mmol, 90.4%) を淡い黄色の固体として得た。

## 【0068】

TLC および <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) の結果は次の通りである。TLC R<sub>f</sub> 0.30 (hexane/acetone = 18/1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) d 1.59-1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.71 (tt, 4H, J = 5.4, 5.4 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 2.85 (brs, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.09 (brs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.92 (d, 1H, J = 1.9 Hz, aromatic), 6.97 (dd, 1H, J = 1.9, 8.4 Hz, aromatic), 7.01 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic).

## 【0069】

## [Step 3]

2 - (1-ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) ベンゼンアミン (2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)benzenamine) (173 mg, 0.708 mmol) のジクロロメタン (dichloromethane) (5 mL) 溶液に連続的に イソニコチノイルクロライドハドロクロライド (isonicotinoyl chloride hydrochloride) (151 mg, 0.850 mmol), トリエチルアミン (triethylamine) (450  $\mu$ L, 3.23 mmol), 及び触媒量の 4 - (ジメチルアミノ) ピペリジン (4-(dimethylamino)pyridine) が 0 ° C で添加された。混合物は室温に戻され、19 時間半攪拌された。これに水が添加され、混合物は、酢酸エチル (x 3) で抽出された。有機抽出物混合物は重炭酸ナトリウム飽和水溶液で洗浄され、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥され、濾過され、そして減圧濃縮された。残査は シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 g, hexane/ethyl acetate = 1.5/1) で精製され、N- [2 - (1-ピペリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル] - 4 - ピリジンカルボキシアミド N-[2-(1-piperidinyl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-4-pyridinecarboxamide (SRPIN-1) (83.8 mg, 0.240 mmol, 33.9%) が淡い黄色固体として得られた。

## 【0070】

TLC及び $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)の結果は次の通りである。  
TLC  $R_f$  0.40 (hexane/ethyl acetate = 1/1);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) d 1.67-1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.78 (tt, 4H,  $J = 5.5, 5.5$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 2.88 (t, 4H,  $J = 5.5$  Hz,  $2\text{CH}_2$ ), 7.29 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, aromatic), 7.40 (dd, 1H,  $J = 1.8, 8.2$  Hz, aromatic), 7.76 (dd, 2H,  $J = 2.0, 4.4$  Hz, aromatic), 8.86 (dd, 2H,  $J = 2.0, 4.4$  Hz, aromatic), 8.87 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, aromatic), 9.53 (s, 1H, NH).

なお、上記で、カラムクロマトグラフィーはシリカゲル(MERCK 9385-5B, 70-230 mesh)を用いて行った。

#### 【0071】

薄層クロマトグラフィー (TLC) は シリカゲル(MERCK 5715, silica gel 60 F<sub>254</sub>)で前もってコートされたガラスプレートを用いて行った。

$^1\text{H}$  NMR スペクトルはJEOL JNM a-400 スペクトロメータを用いて得られた。 $\text{CDCl}_3$  (ISOTEC) が NMR スペクトルを得るための溶媒として用いられた。ケミカルシフトは  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$  を内部標準としてダウンフィールドにppmで表され、カップリング常数 ( $J$ ) はHzで示される。略号 s、d、t、m、及び brはシングレット、ダブルット、トリプレット、マルチプレット及びブロードをそれぞれ表す。

#### 【0072】

[実施例 1 A] HIV感染細胞におけるSR蛋白質のリン酸化

ヒト胎児腎臓由来のFlp-In-293細胞 (R750-07: Invitrogenより購入) に、HIVpNL4-3ゲノムの3マイクログラムを、遺伝子導入試薬Genejuice (70967-4; Novagenより購入) 9マイクロリットルを用いて遺伝子導入を行った。4日後、細胞にSDS-PAGEサンプルバッファを1ミリリットル加えて溶解させ、95度で3分熱変性させた後に、すみやかに氷上において、蛋白質サンプルとした。

#### 【0073】

この蛋白質サンプルをウエスタン解析に用いた。サンプルは4-20%のグラジエントゲルによって、40mA、45分の条件でLaemini のバッファを用いたSDS-PAGEにより分離した。マーカーとしてブロードレンジプレステインドマーカー (02525-35; ナカライ) を用いて分子量を検量した。続いてPROTRANニトロセルロースメンブレン (BA85; Schleicher&Schuell BioScienceより購入) にTransBlot SDセル(170-3940; Bio-radより購入)を用いて160mA、60minの条件でセミドライブロッティングした。ブロッティング終了後、メンブレンはTBSで5分間振盪洗浄し、続けてBlockingOne(03953-95; ナカライより購入)を用いてブロッティングを1時間、室温で行った。メンブレンを再度TBSで洗浄し、TBSで希釈したリン酸化SR蛋白質を認識するマウスモノクローナル104抗体(Mab104; ATCCよりハイブリドーマを購入)、マウス抗SC35抗体 (S4045; BDTransductionより購入)、マウスモノクローナル抗SF2抗体 (AK103; Dr. Adrian Krainer氏より供与) と4度over nightでインキュベートした。

#### 【0074】

メンブレンをTBSで室温10分振盪洗浄し、これを3回行った。その後、二次抗体としてHRP標識されたヒツジ抗マウスIgG抗体 (NA9310; アマシャムより購入) をTBSで希釈し、メンブレンと室温で1時間インキュベートした。メンブレンをTBSで室温10分振盪洗浄し、これを3回行った。その後、ECL Detection Reagents (RPN2105; アマシャムより購入) を用いた化学発光法により、LAS1000CCDカメラ (LAS1000; 富士フィルム) で取り込みを行った。結果を図1Aに示す。

#### 【0075】

その結果、HIVpNL4-3の感染にともなってMab104抗体、SC35抗体、SF2抗体を用いたウエスタン解析のシグナルは認められなくなり、SR蛋白質が脱リン酸化されているだけでなく、SC35やSF2という内在性のSR蛋白質が分解されていることが明らかとなった。

#### 【0076】

[実施例 1 B] SR蛋白質の分解

ヒト胎児腎臓由来のFlp-In-293細胞に、HAタグを融合したSRp75, SRp55, SRp40遺伝子

のプラスミド (HA-SRp75, HA-SRp55, HA-SRp40; Dr. Woan-Yuh TARNより供与) 1マイクログラムをGenejuiceを用いて遺伝子導入し、36時間後に、ユビキチンプロテアソーム阻害剤であるMG132(474790; CHALBIOCHEMより購入)を終濃度(10 $\mu$ M)で加えた。さらに10時間後に、SDS-PAGEサンプルバッファーで細胞を溶解して熱変性を行い、蛋白質サンプルとした。これを同様にSDS-PAGEを行い、ウサギ抗HA抗体 (H1803; サンタクルーズより購入)を一次抗体、ロバ抗ウサギIgG抗体 (NA9340; アマシヤムより購入)を二次抗体としてウエスタン解析した。結果を図1Bに示す。

#### 【0077】

その結果、MG132を添加した細胞では、コントロールに比べて、強いシグナルが得られたことから、MG132によってSR75, SR55, SR40の蛋白質分解が阻害される結果を得た。また、この他のSR蛋白質についても同様のことが解っている (data not shown) ことから、SR蛋白質はMG132によるユビキチンプロテアソームを介して蛋白質分解されていることが明らかとなった。

#### 【0078】

[実施例2A] SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質のリン酸化

Flp-In-293細胞を用いて、マウスSRPK2遺伝子をFlp-In部位に1コピー導入したSRPK2安定的発現細胞を複数株樹立した。解析では親株Flp-In293をmockとして、複数株樹立したSRPK2安定的発現細胞のうちSRPK2-2を実験に用いた。この2つの細胞にpNL4-3を遺伝子導入して、4日後にHIV感染における内在性SR蛋白質の動態をウエスタン解析により調べた。

#### 【0079】

図1Aと同様にウエスタン解析を行ったところ、SRPK2-2細胞にHIVpNL4-3ゲノムを遺伝子導入した場合に、Mab104抗体でSRp35、SRp40、SRp55、SRp75の位置にシグナルが認められることから、Mab104で認識されるSRドメインはリン酸化状態にあることが明らかとなった。

#### 【0080】

さらに、SC35抗体、SF2抗体を用いたウエスタン解析によるとHIVpNL4-3ゲノムを遺伝子導入したSRPK2-2細胞ではSC35、SF2のシグナルが認められた。図2Aに示す。

これらの結果、通常HIV感染に伴ってSR蛋白質は分解されるが、SRPK2安定的発現細胞ではSR蛋白質のリン酸化状態が維持され、結果としてSR蛋白質が安定化される。このことは、SRPK2安定的発現細胞では、SR蛋白質がリン酸化状態にあり、ユビキチンプロテアソームを介した蛋白質の分解が起きないと考えられる。

#### 【0081】

[実施例2B] SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質の存在

親株Flp-In293 (mock) とSRPK2遺伝子をFlp-In部位に1コピー導入したSRPK2安定的発現Flp-In-293細胞 (SRPK2-2細胞) に、HIVpNL4-3ゲノムを1マイクログラムと、HAタグを融合したSRp75, SRp55, 及びSRp40遺伝子のプラスミド (HA-SRp75, HA-SRp55, HA-SRp40; Dr. Woan-Yuh TARNより供与) 1マイクログラムをGenejuiceにより遺伝子導入し、36時間後にサンプルを回収して、ウエスタン解析を行った。結果を図2Bに示す。その結果、HIV感染に伴ってFlp-In293細胞ではSC35, SF2だけでなく、SRp75, SRp55, SRp40についても、抗HA抗体によるシグナルが無くなるか、または弱くなっていた。またSRPK2-2細胞では、同様にシグナルはコントロールに比べて弱くなっているが、SC35, SF2と同様にSRp75, SRp55, SRp40のシグナルが見られる。

#### 【0082】

これらの結果は、HIV感染に伴ってSR蛋白質の分解が促進されるが、SRPK2-2細胞ではSR蛋白質をリン酸化するので、SR蛋白質が安定化されていることを意味している。

#### 【0083】

[実施例2C] HIVの産生量を測定

実施例2A (図2A) の実験の際に培養上清を回収してHIVの産生量を測定した。遺伝子導入後の培養上清を回収し、培養上清に含まれるHIV外膜蛋白質であるp24の量を、ルミバールELISAシステム (富士レビオ) によって測定した。結果を図2Cに示す。



## 【0084】

その結果、mockの培養上清に比べてSRPK2-2細胞では2.3倍量のHIVが産生されている結果を得た。

## 【0085】

以上のことから、HIV感染に応答してSR蛋白質が脱リン酸化されるが、SR蛋白質を恒常的にリン酸化状態にした場合には、感染に応答したSR蛋白質の制御機構が働かないので、結果としてHIV産生を昂進させることが明らかとなった。

## 【0086】

このことは、HIV感染に応答したSR蛋白質の脱リン酸化は、宿主の防御機構として機能していることを示唆している。

## 【0087】

【実施例3A】 in vivoでのHIVの産生に寄与するSR蛋白質の検討

HIVは、その遺伝子発現過程において宿主の因子を用いて転写、プロセシング、翻訳を行っている。特に、HIVのTat、Revは分断されたエクソンを持ち、その遺伝子発現にはmRNAのスプライシング反応が必須であると想定されている。

## 【0088】

実施例1-5(図1-2)で示した様に、HIV感染に伴って宿主の防御機構が作動し、SR蛋白質は分解されることを示したが、in vivoでのHIVのスプライシング反応や、それに寄与するSR蛋白質については不明である。実際、SR蛋白質は細胞内に複数種類が存在しているので、これらのSR蛋白質をHIVpNL4-3ゲノムとともに遺伝子導入して、その効果を検討した。結果を図3Aに示す。

## 【0089】

Mock、SC35、SF2、SRp40、SRp55、SRp75発現プラスミドを各々Flp-In293細胞に遺伝子導入し、36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

## 【0090】

その結果、mockに比べてSRp40、SRp75ではHIVp24量は増加していることから、SRp40、SRp75にHIV産生を昂進する効果を認めた。

## 【0091】

【実施例3B】 hnRNPA1を用いた、in vivoにおけるHIV産生への効果の検討

図3Bに示したように、一定量(500ng)のSRp40、SRp75発現プラスミドに加えて、hnRNPA1発現プラスミドの量を段階的に増やしてFlp-In293細胞へ遺伝子導入を行った。36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

## 【0092】

その結果、hnRNPA1の量に依存して、ルミパルスELISAシステムにより測定したHIVp24量が減少する結果を得た。すなわちSRp40とSRp75に対して競合的にhnRNPA1が働いて、HIV産生を抑制している。

## 【0093】

このことは、細胞内でHIVの遺伝子発現に、スプライシング反応を介して発現制御していることが示唆された。実際、細胞内にはSRp40やSRp75とhnRNPA1が共存しているので、HIV感染にともなう細胞内SR蛋白質の分解は、細胞内におけるhnRNPA1を優位にして、HIVの遺伝子発現を抑制することで防御機構として成立していると考えられる。

## 【0094】

【実施例4A】 細胞内SR蛋白質のリン酸化を阻害するための、SRPKの阻害剤の探索

リン酸化酵素が共通に持つATP結合部位を標的として、競合的に結合する阻害剤を探索した。スクリーニングの結果ヒットした化合物は、分子量349.35のMaybridge社から既に販売されている化合物の一つであった。しかしながら、リン酸化酵素の阻害に関しては、これまでいかなる発表もなされていない。我々はこれをSRPIN-1(SRpk Inhibitor-1)と名づけた。

## 【0095】

【実施例 4 B】 SRPIN-1を用いたSRPK1のリン酸化活性を阻害の検討  
SF2のRSドメインに相当するRSペプチド (NH<sub>2</sub>-RSPSYGRSRSRSRSRSRSRNSRSRSY-OH) を合成した。これを10mM Tris-HCl (pH 7.5) で1mg/mlになるように溶解した。大腸菌で発現精製した組み換えSRPK1蛋白質を1 $\mu$ g用いて、反応バッファー (250mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM ATP、1 mCi [g-32P] ATP、SRPIN-1終濃度0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 $\mu$ M) 中で30度の湯浴で10分間インキュベートした。このリン酸化酵素の活性測定におけるSRPK1とRSペプチドの量、および反応時間の条件は、予め反応の直線性を検討し、直線性が成立する条件を選んでいる。

#### 【0096】

SRPK1とRSペプチドの反応を10分行った後、反応液をP81フォスフォセルロースメンブレン (P81; Whatman) に滴下し、5%リン酸溶液で洗浄した。洗浄後、P81メンブレンの32Pについての放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。結果を図4Bに示す。

#### 【0097】

その結果、SRPIN-1のSRPK1に対するIC<sub>50</sub>は約400nMである結果を得た。また同様の手法によって検討したCLK1、CLK2、CLK3、CLK4、SRPK2、PRP4、PKA、PKCについては、終濃度10 $\mu$ Mでも阻害効果を見出せなかったことから、SRPIN-1はSRPK1の特異的酵素阻害剤と言える。

#### 【0098】

【実施例 4 C】 SRPIN-1を用いてin vivoにおけるSR蛋白質のリン酸化阻害と、それに伴うSR蛋白質の分解を誘導の検討

Flp-In293細胞にHA-SRp75プラスミドを遺伝子導入して、36時間後にMG132(終濃度10 $\mu$ M)、SRPIN-1(10、20、50 $\mu$ M)をそれぞれ添加して15時間インキュベートした。その後、SDS-PAGEサンプルバッファーで細胞を溶解して、蛋白質サンプルとした。このサンプルを、SDS-PAGEして、抗HA抗体を用いたウエスタン解析を行った。また蛋白質量のコントロールとして抗 $\beta$ アクチン抗体を用いてウエスタン解析を行った。結果を図4Cに示す。

#### 【0099】

その結果、SRPIN-1の濃度依存的にHA抗体のシグナルが弱くなる結果を得た。このことは、SRPIN-1依存的に内在性のSRPK1活性が阻害されたことで、結果としてSRp75蛋白質が分解されたことを示している。

#### 【0100】

このことは、SRPIN-1によるSRPK1の阻害は、in vivoにおいてSR蛋白質のリン酸化を阻害することが可能であり、その結果としてSR蛋白質は不安定化して蛋白質分解が促進されることを意味している。

#### 【0101】

【実施例 4 D】 SRPIN-1の添加による、HIV感染を阻害の検討

MT-4細胞に、293T細胞で調製したHIVビリオンを添加して、感染実験を行った。まずウイルス調製液をMT-4細胞に加えると同時に、SRPIN-1(終濃度0.5、10、20 $\mu$ M)を添加する。2時間37度5% CO<sub>2</sub>の培養条件下でインキュベートした後、細胞を遠心して新しい培養液に交換する。その後、48時間後に培養上清を回収してルミパルスELISAシステムによってHIVp24の量を測定した。結果を図4Dに示す。

#### 【0102】

その結果、ルミパルスELISAシステムによって測定したHIVp24の量は、SRPIN-1の濃度に依存して減少する結果を得た。このことは、SRPIN-1がHIV産生を濃度依存的に阻害できることを意味している。

【図面の簡単な説明】

#### 【0103】

【図1A】 「HIV感染細胞におけるSR蛋白質のリン酸化」 pNL4-3ゲノムを遺伝子導入したFlp-In-293細胞中のリン酸化SR蛋白質を、抗リン酸化SR蛋白質マウスモノクローナル抗体 (Mab104)、抗SC35マウス抗体、及び抗SF2マウ

ス抗体を用いたウエスタン解析より調べた。

【図 1 B】「SR 蛋白質の分解」 Flp-In-293細胞に、HAタグを融合したSRp75, SRp55, SRp40遺伝子のプラスミド遺伝子導入し、MG132(474790; CHALBIOCHEMより購入)を終濃度(10  $\mu$ M)で加えた。細胞を溶解して熱変性を行い、蛋白質サンプルとしSDS-PAGEを行い、ウサギ抗HA抗体を一次抗体、ロバ抗ウサギIgG抗体を二次抗体としてウエスタン解析した。

【図 2 A】「SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質のリン酸化」 Flp-In-293細胞にマウスSRPK2遺伝子を導入したSRPK2安定的発現細胞(SRPK2-2)及び親株Flp-In293(mock)の2つの細胞にpNL4-3を遺伝子導入して、4日後にHIV感染における内在性SR蛋白質の動態を図1Aと同様にウエスタン解析により調べた。

【図 2 B】「SRPK2安定的発現細胞におけるSR蛋白質の存在」 図 2 Aと同じmockとSRPK2-2細胞に、HIVpNL4-3ゲノムと、HAタグを融合したSRp75, SRp55, SRp40遺伝子のプラスミドを遺伝子導入し、36時間後にサンプルを回収して、ウエスタン解析を行った。

【図 2 C】「HIVの産生量を測定」 上記図2Aの場合の培養上清を回収してHIVの産生量を測定した。

【図 3 A】「in vivoでのHIVの産生に寄与するSR蛋白質の検討」 Mock、SC35、SF2、SRp40、SRp55、SRp75発現プラスミドを各々Flp-In293細胞に遺伝子導入し、36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

【図 3 B】「hnRNP A1を用いた、in vivoにおけるHIV産生への効果の検討」 一定量(500ng)のSRp40、SRp75発現プラスミドに加えて、hnRNP A1発現プラスミドの量を段階的に増やしてFlp-In293細胞へ遺伝子導入を行った。36時間後に培養上清を回収し、ルミパルスELISAシステムを用いてHIVp24の量を測定した。

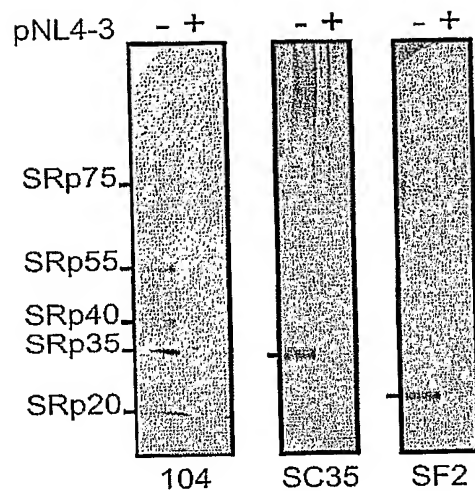
【図 4 A】「細胞内SR蛋白質のリン酸化を阻害するための、SRPKの阻害剤の探索」 SRPIN-1(SRPk Inhibitor-1)の構造式

【図 4 B】「SRPIN-1を用いたSRPK1のリン酸化活性を阻害の検討」 SF2のRSドメインに相当するRSペプチド10mM Tris-HCl(pH 7.5)で1mg/mlになるように溶解した。SRPK1蛋白質を1  $\mu$ g用いて、反応バッファ(250mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM ATP, 1 mCi [ $g$ -<sup>32</sup>P] ATP, SRPIN-1終濃度0.1、0.3、1.0、3.0、10.0  $\mu$ M)中で30度の湯浴で10分間インキュベートし、反応液をP81フォスフォセルロースメンブレン(P81; Whatman)に滴下し、5%リン酸溶液で洗浄した。洗浄後、P81メンブレンの<sup>32</sup>Pについての放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

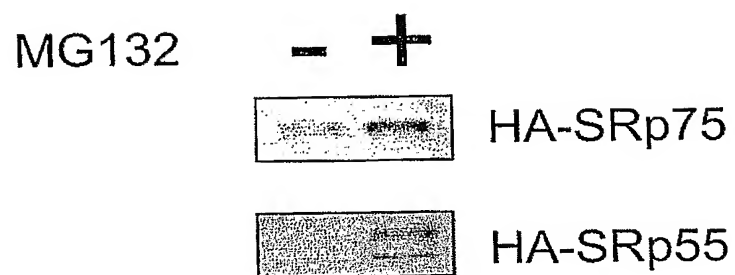
【図 4 C】「SRPIN-1を用いてin vivoにおけるSR蛋白質のリン酸化阻害と、それに伴うSR蛋白質の分解を誘導の検討」 Flp-In293細胞にHA-SRp75プラスミドを遺伝子導入して、36時間後にMG132(終濃度10  $\mu$ M)、SRPIN-1(10、20、50  $\mu$ M)をそれぞれ添加して15時間インキュベートした。その後、細胞を溶解して、SDS-PAGEして、抗HA抗体を用いたウエスタン解析を行った。また蛋白質量のコントロールとして抗 $\beta$ アクチン抗体を用いてウエスタン解析を行った。

【図 4 D】「SRPIN-1の添加による、HIV感染を阻害の検討」 MT-4細胞に、293T細胞で調製したHIVビリオンを添加すると同時に、SRPIN-1(終濃度0.5、10、20  $\mu$ M)を添加した。2時間37度5% CO<sub>2</sub>の培養条件下でインキュベートした後、細胞を遠心して培養液に交換後、48時間後に培養上清を回収してルミパルスELISAシステムによってHIV p24の量を測定した。

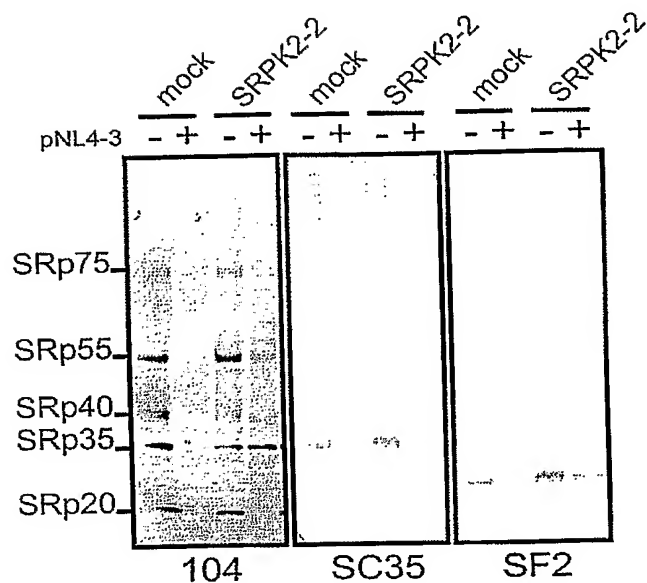
【書類名】 図面  
【図 1 A】



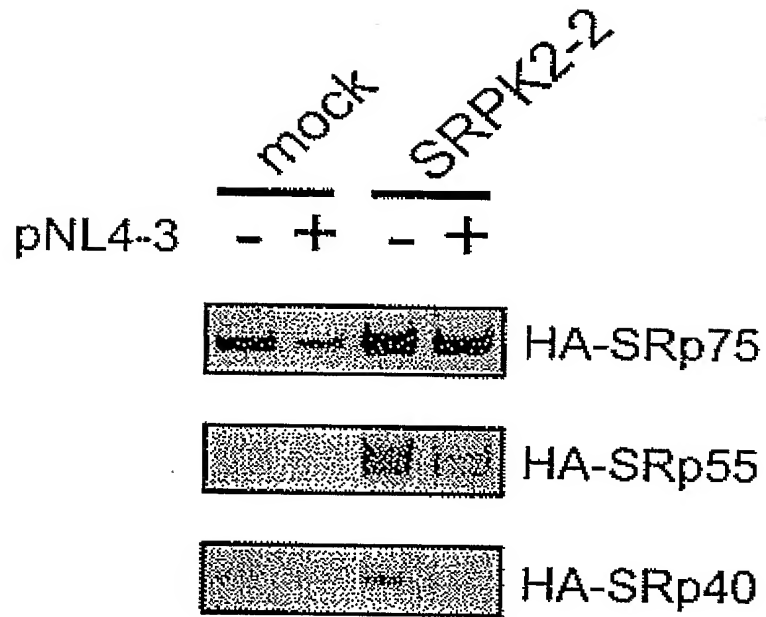
【図 1 B】



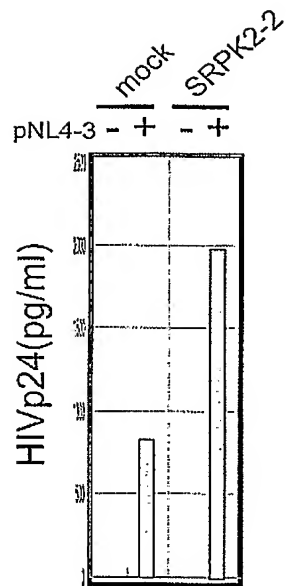
【図 2 A】



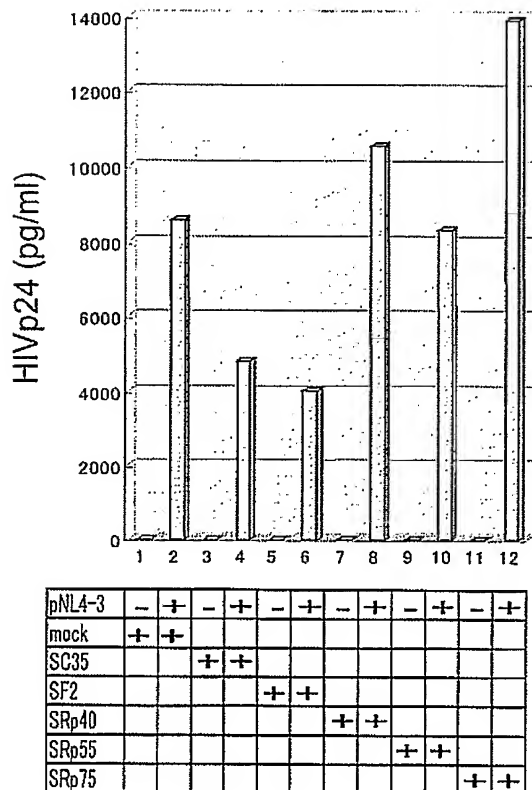
【図 2 B】



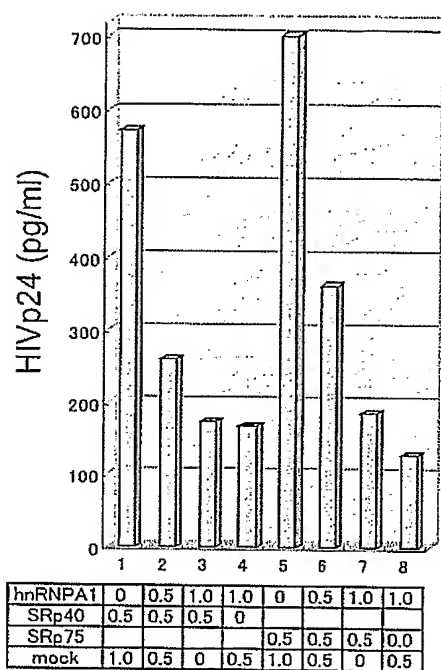
【図 2 C】



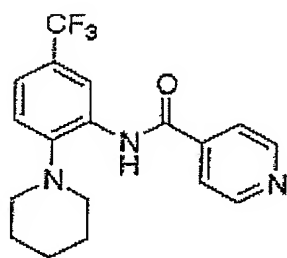
【図 3 A】



【図 3 B】

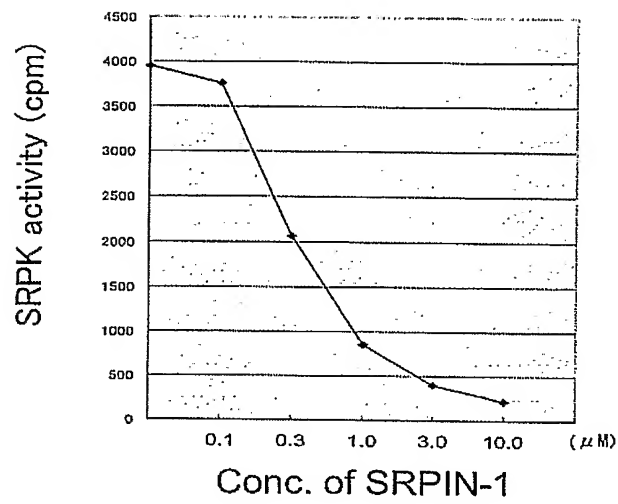


【図 4 A】

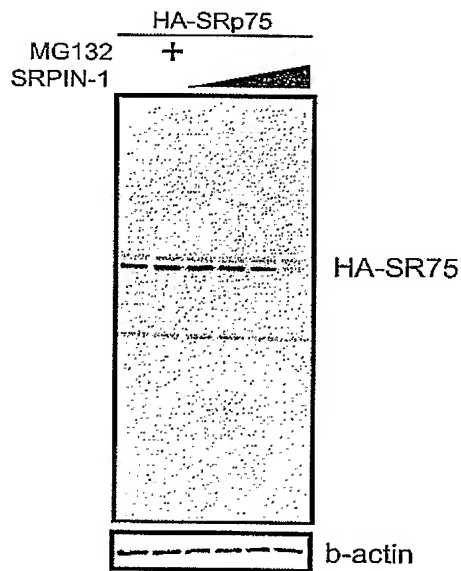


SRPIN-1(C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O)  
MW349.35

【図 4 B】

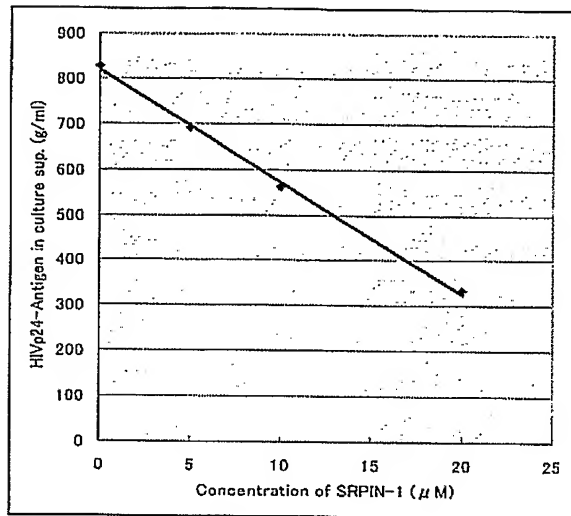


【図 4 C】





【図 4 D】 .



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 SARSをはじめ、種々の新規なウイルスの出現に伴い、新規なウイルスにも対応できる、適用性が広く、しかも、持続性の高い抗ウイルス剤の開発を課題とする。

【解決手段】 本願発明は、(1) SR蛋白質の活性を低減又は阻害することによる抗ウイルス剤、より具体的には、(i) SR蛋白質の脱リン酸化を促進させることによる抗ウイルス剤、及び(ii) SR蛋白質をリン酸化させる蛋白質を阻害することによる抗ウイルス剤、更に(2) SR蛋白質の発現を阻害することによる抗ウイルス剤、並びに、(3) SR蛋白質と逆の機能をする蛋白質を活性化することによる抗ウイルス剤を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 3 5 0 8 5

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 8 1 2 0 0 0 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 9 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区湯島 1 - 5 - 4 5 東京医科歯科大学 難治疾患  
研究所内

氏 名

萩原 正敏